

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 35 756.0

Anmeldetag: 27. Juli 1999

Anmelder/Inhaber: MOLOGEN Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH, Berlin/DE

Bezeichnung: Kovalent geschlossenes Nukleinsäuremolekül zur Immunstimulation

IPC: C 07 H, A 61 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 5. Juni 2002  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

## **Kovalent geschlossenes Nukleinsäuremolekül zur Immunstimulation**

### Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Modulation der Aktivität des menschlichen oder tierischen Immunsystems durch Nukleinsäuremoleküle, besonders solche Nukleinsäuremoleküle, welche unmodifizierte CpG-Nukleosidbausteine aufweisen, die immunmodifizierend wirken können.

### Hintergrund

Seit einigen Jahren ist bekannt, daß bestimmte kurze Nukleinsäuresequenzen eine erhebliche physiologische Wirkung aufweisen können, indem sie über bisher unbekannte Mechanismen Effektorzellen des Immunsystems stark stimulieren. Diese immunstimulatorischen Nukleinsäuresequenzen („ISS“) sind nur einige Basen lang und wirken nicht über die Expression von auf ihnen kodierten Proteinen. Die meisten bekannten immunmodifizierenden kurzen Oligodesoxyribonukleotidsequenzen („ODN“) enthalten ein unmethyliertes Cytosin-Guanosin-Motiv (CpG-Motiv) (Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation; Nature 1995 Apr 6 374:6522 546-9). Es wird angenommen, daß die Erkennung dieses Motives durch bisher nicht aufgeklärte Erkennungsmechanismen in der eukaryoten Zelle zu einer Art Notrufmechanismus führt, der eine gegen virale oder bakterielle Erreger gerichtete Reaktion auslöst. Gemäß diesem Erklärungsvorschlag soll die Erkennung von CpG-Motiven, deren Vorkommen im Genom von Eukaryonten gegenüber dem von Prokaryonten erheblich unterdrückt ist, dem höheren Tier als „Warnsignal“ dienen. Das Vorhandensein der CpG-Motive signalisiert nach dieser Theorie eine Infektion durch prokaryote Erreger, und deren Erkennung ermöglicht eine Bekämpfung unabhängig von bzw. vor der Ausbildung einer T-Helferzell-vermittelten Immunantwort. Die T-Helferzell-unabhängige Stimulierung und Proliferation von B-Zellen wird dadurch ermöglicht, daß für T-Zell- und B-Zell-Aktivierung notwendige kostimulatorische Signale, vor allem die Sekretion von Zytokinen der zellulären sog. Typ 1-Antwort (Th1-spezifische Zytokine wie Interferon gamma, IL-7, IL-12), durch die CpG-abhängigen Signalwege bereitgestellt werden. Außerdem wird durch ISS die Aktivität von NK-Zellen und Makrophagen erhöht. Die Aktivität der sog. Typ-2 Zytokine (IL-4, IL-10) wird demgegenüber unterdrückt, wahrscheinlich durch einen Antagonismus zwischen Th1- und Th2-Antwort (Seder RA und Paul WE, Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells; Annu Rev Immunol. 1994;12:635-73).

Die starke Stimulation der zellulären Immunantwort ermöglicht eine Einflußnahme auf Regelkreisläufe, die ohne Eingriff nicht zu einer für den Patienten befriedigenden Immunaktivität führen. Dazu gehört die Induktion einer Antwort gegen „schwache“, d.h. im Rahmen der MHC-I-Präsentation nicht aktivierende Antigene, wie z.B. Bruchpunktpeptide

5 aus chromosomal Translokationen oder mutierten Onkogenen, wie sie bei Tumorerkrankungen häufig auftreten (Melfi CJ, Kast WM; T-cell immunotherapy of cancer; Res Immunol 1991 Jun-Aug;142(5-6):425-9; ebenfalls: Pasternak G, Hochhaus A, Schultheis B, Hehlmann R; Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects; J Cancer Res Clin Oncol 1998;124(12):643-60). Ebenfalls erwünscht könnte das Brechen der Toleranz

10 gegenüber Autoantigenen, wie etwa der im Tumorzellen des malignen Melanoms exprimierten und MHC-I-repräsentierten Tyrosinase oder Tyrosinhydroxylase (Weber LW, Bowne WB, Wolchok JD, Srinivasan R, Qin J, Moroi Y, Clynes R, Song P, Lewis JJ,

15 Houghton AN; Tumor immunity and autoimmunity induced by immunization with homologous DNA; J Clin Invest 1998 Sep 15;102(6):1258-64; Surman DR, Irvine KR, Shulman EP,

20 Allweis TM, Rosenberg SA, Restifo NJ; Generation of polyclonal rabbit antisera to mouse melanoma associated antigens using gene gun immunization Immunol Methods; 1998 May 1;214(1-2):51-62 ) sein. Ein weiterer, erheblich wichtiger Aspekt ist der Adjuvanzeffekt der ISS bei prophylaktischen Impfungen sowie die Möglichkeit, die Reaktion auf eine bestehende Infektion von einer Typ-2-Antwort auf eine Typ-1-Antwort „umzupolen“ und so zur

25 Bekämpfung des Erregers instand zu setzen (Kovarik J, et al. CpG oligodeoxynucleotides can circumvent the Th2 polarization of neonatal responses to vaccines but may fail to fully redirect Th2 responses established by neonatal priming.,J Immunol. 1999 Feb 1;162(3):1611-7). Für eine Vielzahl von Erregern ist gezeigt worden, daß der Typ der Immunantwort den Verlauf der Infektion bzw. das Überleben des Patienten entscheidend beeinflußt. Soweit allergische Reaktionen ein Überschießen einer Typ-2-Antwort darstellen, wird auch für solche Indikationen ein therapeutischer Effekt von ISS erwartet.

30 Es ist beobachtet worden, daß bestimmte CpG-haltige Sequenzen einen die Stimulation durch ISS neutralisierenden Charakter haben, das heißt, das solche Sequenzen den stimulatorischen Effekt der ISS unterdrücken können, wenn sie diesen zugegeben werden (Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL; Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs; Proc Natl Acad Sci U S A 1998 Oct 13;95(21):12631-6). Ohne den zugrundeliegenden Mechanismus der Wirkung dieser als neutralisierende CpG ("CpG-N") beschriebenen Sequenzmotive genau aufgeklärt zu haben, implizieren die Autoren der zitierten

35 Veröffentlichung, daß dieser Effekt auf eine Hemmung der ISS-Stimulation beschränkt sei.

Soweit der Mechanismus der Immuninduktion durch ISS nicht geklärt ist, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß auch andere immunmodifizierende Wirkungen von diesen CpG-N-Motiven ausgehen, die therapeutisch verwertbar wären.

- Es gibt mindestens eine Krankheit beim Menschen, den systemischen Lupus Erythematosus, die sich durch die Nachweisbarkeit von anti-DNA-Antikörpern im Patientenserum auszeichnet und bei der ein etiologischer Zusammenhang mit einer Reaktion auf bakterielle ISS vermutet wird (Krieg AM, CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus?, J Clin Immunol 1995 Nov;15(6):284-92). Für solche und andere Indikationen wäre eine Hemmung des zugrundeliegenden Mechanismus durch CpG-N-Motive vorteilhaft.
- Unabhängig von der Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus ist das Potential der CpG-Sequenzen für die Beeinflussung der Immunantwort erheblich und hat zu einem explosiven Interesse der Wissenschaft an dem Phänomen und den Möglichkeiten seiner Anwendung in Therapie und Prophylaxe von Infektionen, Tumorerkrankungen und Immundefekten geführt.

#### Stand der Technik

Die Literatur zu ISS behauptet (s. z.B. WO09818810A1, S. 17, II 29-30) und es ist auch (s.u.) von den Autoren der hier vorliegenden Erfindung gezeigt worden, daß CpG-haltige, immunstimulatorische Sequenzen eine höhere Wirkung zeigen, wenn sie einzelsträngig vorliegen. Die Verabreichung kurzer, offenkettiger einzelsträngiger ISS-Oligodesoxynukleotide zur Immunmodifikation liegt demnach nahe und ist Gegenstand zahlreicher experimenteller Ansätze zur Behandlung von Infektions-, Tumor- und Autoimmunerkrankungen. Allerdings werden offenkettige einzelsträngige Oligodesoxynukleotide von extra- und intrazellulären Exonukleasen sehr schnell abgebaut und sind deshalb *in vivo* schwer einsetzbar. Die genannten Nukleasen haben eine erheblich gesenkte enzymatische Aktivität gegenüber modifizierten Phosphoresterbindungen im Rückgrat der Nukleinsäurepolymere; dies hat dazu geführt, daß Phosphorthioester ("Thioate") oder reduzierte Phosphorverbindungen (Phosphonate) in chiraler oder achiraler Form für solche Anwendungen eingesetzt werden, in denen einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle in den Patienten eingebracht werden sollen. Diese modifizierten Verbindungen können durch Festphasensynthese hergestellt werden, z.T. allerdings nur in erheblich aufwendigeren Verfahren im Vergleich mit der klassischen DNA-Amiditsynthese. Diese Verbindungen sind aus der Antisense-Forschung bekannt; in klinischen Studien zu Antisense-Strategien zeigte sich allerdings auch, daß sie erhebliche Nebenwirkungen, vor

allem auf das Blutgerinnungssystem und das Komplementsystem, haben (siehe z.B. Sheehan und Lan, Blood 92, 1617-1625 (1998)). Im Zusammenhang mit der Verwendung von Thiophosphorsäurederivaten zum Nukleaseeschutz von ISS ist außerdem gezeigt worden, daß die Sequenzen weniger stimulatorische Aktivität zeigen, wenn die eigentlich 5 wirksamen Cytosin-Guanosinreste mit den zur Aktivität notwendigen flankierenden Sequenzen selber geschützt sind (siehe dazu WO 98/18810).

Die Lehre von Gebrauch und Herstellung immunstimulatorischer, CpG-enthaltender ISS ist in der Anmeldung WO 98/18810 sowie den darin zitierten Schriften umfassend erläutert.

Ausführlich wird in der Schrift WO 98/18810 auf die Notwendigkeit des Schutzes von 10 Oligodesoxynukleotiden von Exonukleasen eingegangen. Es werden mehrere Lösungsvorschläge für das Problem der mangelnden Stabilität *in vivo* genannt, die sich jedoch jeweils ausdrücklich auf einzelsträngige lineare ODN beschränken; so werden Thiophosphatester, Dithiophosphatester oder Phosphonate genannt. Die Möglichkeit der Stabilisierung des ODN durch Ausbildung von Sekundärstrukturen, vor allem einer 15 Haarnadel (sog. Stamm-Schleifen-Struktur, engl. „stem-loop“) wird in WO 98/18810 erwähnt. Die Herstellung und der Gebrauch von Phosphothioatoligomeren im Zusammenhang mit immunstimulatorischen Sequenzen ist in den Schriften US 5.663.153, US 5.723.335 sowie in US 5.856.462 beschrieben.

Eine andere Strategie zum Schutz der einzelsträngigen Sequenzen ist in der Anmeldung 20 US 5.750.669 beschrieben. Dabei werden die Enden des Oligomers mit über 5'-5'- und 3'-3'-Bindungen gekoppelten Nukleosidresten versehen, die den exonukleolytischen Abbau hemmen.

Lineare Oligodesoxynukleotide, welche eine Haarnadel-Struktur am 3'-Ende aufweisen (Hosono et al., Biochim Biophys. Acta 244, 339-344 (1995)) sind aus der Antisense- 25 Forschung bekannt.

Doppelt-haarnadelförmige oder kovalent geschlossene „Hantel“-förmige ODN sind aus experimentellen Ansätzen bekannt, bei denen die Kompetition von Bindungsstellen für DNA-bindende Proteine wie Transkriptionsfaktoren im Mittelpunkt der Untersuchung stand (Lim et al. 1997, Nuc. Acids Res. 25, 575-581; Blumenfeld et al., Nuc. Acids Res. 1993, 21, 3405- 30 3411).

Die Autoren der die gesamte technische Lehre der immunstimulatorischen Sequenzen begründenden Anmeldeschrift WO 98/18810 sprechen in einer Publikation davon, daß zum gegebenen Zeitpunkt die Verwendung isolierter ISS wegen deren Stabilitäts- und Toxizitätsproblemen nicht praktikabel sei und sie in Vektorsequenzen eingebaut werden



müßten (Weeratna R, Brazolot Millan CL, Krieg AM, Davis HL; Reduction of antigen expression from DNA vaccines by coadministered oligodeoxynucleotides. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 1998 Aug;8(4):351-6).

Zusammenfassend ist also festzustellen, daß ISS-ODN ein erhebliches Potential haben, vorteilhafte therapeutische oder prophylaktische immunologische Ansätze zu ermöglichen, jedoch aufgrund der mangelnden Stabilität oder zu hohen Toxizität der wirksamen einzelsträngigen Moleküle für die Anwendung im humanmedizinischen Bereich verbessert werden müssen.

Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, geeignete Molekülstrukturen zur Verfügung zu stellen, welche immunstimulatorische oder immunmodifizierende exonukleasestabile Desoxyribonukleotidsequenzen enthalten, wobei auf die aus der Natur bekannten Bausteine der phosphorsäurediesterverknüpften Desoxyribonukleinsäure zurückgegriffen werden soll.

#### Erfindungsgemäße Lösung

- 15 Die Bemühungen hinsichtlich der Herstellung nukleasestabiler ISS-ODN konzentrierte sich in der Vergangenheit hauptsächlich auf die Bereitstellung neuer, besser verträglicher Basenmodifikationen in einzelsträngig-linearen Molekülen. Um zu einer besseren Einschätzung der Bedeutung des Einzelstranganteils in den ODN zu kommen, wurden Experimente durchgeführt, in denen die zu untersuchenden Sequenzen teilweise 20 einzelsträngig, doppelsträngig als zwei lineare hybridisierende Stränge sowie als teilweise doppelsträngiges, kovalent geschlossenes ringförmiges Molekül synthetisiert wurden. Überraschenderweise zeigte sich, daß auch doppelsträngige Moleküle mit der relevanten immunstimulatorischen Sequenz im Doppelstrangbereich eine nennenswerte stimulatorische Wirkung ausübten, obwohl nicht anzunehmen wäre, daß diese Sequenz außerhalb eines stark denaturierend wirkenden Milieus hauptsächlich im Einzelstrang vorliegt. Des weiteren 25 zeigte sich allerdings überraschenderweise, daß Moleküle, welche die stimulatorisch wirkenden Sequenzmotive im Einzelstrang-Schleifenbereich aufwiesen, neben der erwarteten stimulatorischen Aktivität eine sehr hohe Stabilität im Serum aufwiesen, was ihre Verwendung als ISS-ODN nahelegte.
- 30 Erfindungsgemäß wird demnach die oben geschilderte Aufgabe dadurch gelöst, daß man kurze Desoxyribonukleinsäuremoleküle herstellt, welche aus einer ringförmig geschlossenen Folge von Nukleosidresten bestehen. Solche ringförmig geschlossenen Desoxyribonukleinsäuremoleküle kann man aus offenkettigen Desoxyribonukleinsäuremolekülen, welche eine in Teilen selbstkomplementäre Sequenz

aufweisen und miteinander oder einem zweiten Molekül ein intermediär stabiles Hybrid bilden können, welches einen geschlossenen Doppelstrangbereich mit einer Lücke im Zucker-Phosphatrückgrat aufweist, durch Ligation dieser Lücke im Rückgrat durch ein geeignetes Enzym, etwa die DNA-Ligase aus dem Bakteriophagen T4, gewonnen. Alternativ

- 5 kann ein erfindungsgemäßes Molekül auch durch intramolekulare Ligation eines Moleküls, welches mindestens zwei selbstkomplementäre Bereiche aufweist, welche durch nur eine Lücke im Phosphatrückgrat getrennt sind, gewonnen werden.

Die gewonnenen Moleküle weisen keine freien 5'- oder 3'-Enden auf und sind somit nicht für Exonukleasen zugänglich.

10 Beispiele:

Beispiel 1: Synthese der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle

5'-Phosphorylierte ODN der Sequenz CCTAGGGGTT ACCACCTTCA TTGGAAAACG

TTCTCGGGG CGTTCTTAGG TGGTAACC (TIB-Molbiol, Berlin) wurden 5 min auf 90°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt, um die Ausbildung der Haarnadelstruktur zu ermöglichen. Selbstkomplementäre Überhänge wurden bei einer Endkonzentration von 1 15 µg/µl DNA in Gegenwart von T4-DNA Ligase (0,1 U/µg ODN) 24 h bei 37°C ligiert. Nach Phenolextraktion und anschließender Extraktion mit Chloroform sowie Präzipitation mit Isopropanol in Anwesenheit von MgCl<sub>2</sub> (f.c. 10 mM) und NaAc (f.c. 300 mM) wurde das Produkt nach Zentrifugation und Aufnehmen in Wasser erhalten.

20 Zur Reinigung von Endotoxinen wurde das Ligationsprodukt einer anschließenden Anionenaustauschchromatographie (Trägermaterial: LiChrospher DMAE, Merck Darmstadt; 0-1M NaCl in 50 mM NaPhosphat) unterworfen und durch Isopropanolpräzipitation konzentriert. Für in-vivo-Versuche wird das Verfahren unter sterilen Bedingungen durchgeführt und das Endprodukt in sterilem PBS aufgenommen.

25

Beispiel 2: Milzzellengewinnung und Zellkultur, Zytokin-Assays

Milzzellen wurden aus frischen Milzen von 5-10 Wochen alten BALB/c Mäusen (Bomholtgard Breeding & Research Center, Dänemark) gewonnen. Zwei frisch isolierte Milzen wurden mit

30 Hilfe eines 40 µm Metallfilters homogenisiert und die gewonnenen Zellen wurden in 20 ml RPMI 1640 (10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, Biochrom, Berlin) aufgenommen. Erythrozyten und Plättchen wurden durch Gradientenzentrifugation (Ficoll 1.077; Biochrom, Berlin) entfernt. Die Zellen wurden in einer Endkonzentration von 10<sup>6</sup> Zellen/ml bei 37°C in einem mit 5% CO<sub>2</sub> gespülten Brutschrank inkubiert.

10

$10^5$  frisch isolierte Milzzellen wurden in 96-Loch-Platten mit den nach Beispiel 1 hergestellten Konstrukten für 24 h inkubiert. Die Konzentration der Konstrukte betrug dabei 2  $\mu$ M. Zytokine im Überstand wurden durch ELISA (Biosource, Belgium) gemäß den Beschreibungen des Herstellers des ELISAs bestimmt. Für alle Meßpunkte wurden mindestens 5 Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 2 gezeigt. Es wurden 6 Konstrukte unterschiedlicher Architektur, aber gleicher ISS untereinander verglichen. Die ISS sind jeweils durch Unterstreichung gekennzeichnet. Das aktivste Molekül ist das Phosphorthorthioat-geschützte, lineare Molekül (ISS30-IPS). Das ungeschützte Molekül (ISS30-I) zeigt dagegen praktisch keine Stimulation der IL-12-Produktion. Die nächsthöchste Wirkung in diesem Assay zeigt das Molekül, welches die ISS in der Schlaufe trägt (ISS30). Das Vergleichskonstrukt ohne ISS (NoSS30) zeigt dagegen keine Wirkung. Liegt die ISS im doppelsträngigen Bereich (ISS30-ds, ISS30-sl), ist die Wirkung demgegenüber deutlich verringert, aber immer noch deutlich über der Kontrolle bzw. dem ungeschützten lineraren 15 Moleköl. Es zeigt sich, daß auch kleinere Konstrukte gleicher Molarität Wirkungen in der gleichen Größenordnung haben können (siehe AT-2L). In diesem Fall liegt die gemessene Wirkung sogar über der des phosphorthioatgeschützten, linearen Moleküls. Ein Konstrukt mit nur einer ISS pro Moleköl zeigt demgegenüber eine verringerte Wirkung (AT-1L). Letztlich läßt sich die Länge des Moleküls auf eine geringe Minimalgröße reduzieren, ohne den Effekt 20 zu verlieren (siehe mini).

### Beispiel 3: Serumstabilität

5  $\mu$ g des Desoxyribonukleotids WOT-11-P (Phosphat-GAAGAACGTT TTCCAATGAT TTTTCATTGG AAAAC) (TIB Molbiol) wurden mit 75  $\mu$ Ci gamma-32P-ATP (6000 Ci/mmol) (NEN) in Anwesenheit von 10 u T4 Polynukleotidkinase (MBI-Fermentas, Leon-Rot) entsprechend den Angaben des Herstellers markiert. Das Enzym wurde durch Erhitzen auf 75 C während 1 h inaktiviert. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 50  $\mu$ l und durch ZG-50 Größenausschluß-Säule (Pharmacia) gereinigt. Das radioaktiv markierte Moleköl wurde mit unmarkiertem, 5'-phosphorylierten WOT-10-P (5'Phosphat-GTTCTTCGGG GCGTTCTTT 25 TTAAGAACGCC) (TIB Molbiol) in Anwesenheit von 1 U T4 DNA Ligase (MBI-Fermentas, Leon-Rot) und 1 mM ATP 2 h bei 37°C umgesetzt. Nichtligierte ODN wurden durch nachfolgende Inkubation mit T7-DNA-Polymerase entfernt. Die Aktivität des erhaltenen Präparats wurde im Szintillationszähler (Beckmann Instruments) zu 78000 cpm/ $\mu$ l, entsprechend 7.800 cpm / ng bestimmt.

Für die Bestimmung der Stabilität der erhaltenen Konstrukte im Serum wurden 2.5 µl der DNA (195.000 cpm entsprechend 25 ng DNA) mit 20 µl nicht-inaktiviertem Fötalen Kälberserum (Life Technologies), alternativ frisch gewonnenem menschlichen Probandenserum, in 180 µl RPMI Medium (Life Technologies) zugegeben. Alle

- 5 Bestimmungen wurden dreifach durchgeführt. Die Proben wurden bei 37°C inkubiert; 20 µl Aliquotproben wurden bei 0, 1, 2, 7, 11 und 24 h genommen und bei -40 C aufbewahrt. Je 5 µl der Proben wurden mit 20 µg/ml Proteinase K (Life) während 1h verdaut. Die Proben wurden anschließend denaturierender Polyacrylamidelektrophorese unterworfen, die Gele digitalisiert (Molecular Dynamics) und die Bandenintensität verglichen (IP Labgel). Die  
10 Auswertung ist in Abb. 3 gezeigt. Jeder Datenpunkt ist das arithmetische Mittel aus drei Bestimmungen.

#### Beispiel 4: Anwendung der Konstrukte in der Maus

Die Konstrukte wurden in vivo getestet. Sechs Wochen alte weibliche BALB/C Mäuse  
15 wurden mit je 50 µg des entsprechenden Konstrukts in 250 µl steriles PBS intraperitoneal injiziert. Es wurden nach 2, 6, 24 und 72 h je 50 µl Blut entnommen, mit Heparin versetzt, abzentrifugiert, und das Serum bei -70°C gelagert. Die Proben wurden gemeinsam auf IL-12 mit ELISA getestet (s.o.). Alle Präparationen wurden mit dem Endotoxin-Assaysystem aus limulus (LAL-Test, BioWhittaker) auf Endotoxin getestet. Alle Proben hatten einen unter der  
20 Nachweisgrenze liegenden Endotoxin-Gehalt.

#### **Kurze Erläuterung der Zeichnungen**

- Abb. 1 zeigt ein erfindungsgemäßes Kontrukt schematisch. Die ISS sind unterstrichen dargestellt.  
25 Abb. 2 zeigt die Ergebnisse der IL-12 Bestimmungen in-vitro in pg IL-12/ml. Daneben sind die verwendeten Konstrukte schematisch dargestellt.  
Abb. 3 zeigt das Ergebnis der Stabilitätsmessung in fötalem Kälberserum in Abhängigkeit der Zeit.

**Ansprüche:**

1. Desoxyribonukleinsäuremolekül mit immunmodifizierenden Eigenschaften, enthaltend unmethylierte Cytosin-Guanosin-Nukleosidbausteine ("CpG-Motiv"), gekennzeichnet dadurch, daß
  - das Desoxyribonukleinsäuremolekül aus einer einsträngigen, ringförmigen, kovalent geschlossenen Kette von Desoxyribonukleosidresten besteht, und
  - innerhalb des Molekls eine oder mehr Sequenzen der Basenfolge  $N^1N^2CGN^3N^4$  enthalten sind,wobei  $N^1N^2$  ein Element aus der Gruppe GT, GG, GA, AT oder AA,  $N^3N^4$  ein Element aus der Gruppe CT oder TT, sowie C Desoxycytosin, G Desoxyguanosin, A Desoxyadenosin und T Desoxythymidin ist.
2. Desoxyribonukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, wobei die Kette der Nukleinsäurebasen eine teilweise intramolekular selbstkomplementäre Sequenz aufweist, so daß das Molekül eine Stamm-Schlaufenstruktur ausbilden kann.
3. Desoxyribonukleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Sequenz der Basenfolge  $N^1N^2CGN^3N^4$  in der von der Stamm-Schlaufenstruktur gebildeten Schlaufe liegt.
4. Desoxyribonukleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Sequenz
  - die Sequenz CCTAGGGGTT ACCACCTTCA TTGGAAAACC TTCTTAGGGG TGTTCTTAGG TGGTAACC CCTAGGGGTT ACCACCTTCA TTGGAAAACC TTCTTAGGGG TGTTCTTAGG TGGTAACC oder
  - die Sequenz GTTCCTGGAG ACGTTCTTAG GAACGTTCTC CTTGACGTTG GAGAGAAC oder
  - die Sequenz ACCTTCCTTG TACTAACGTT GCCTCAAGGAAGGTTGATCTTCATAACGTTGCCTAGATCA ist, oder
  - eine Desoxyribonukleinsäuresequenz der Basenfolge AACG TTCTCGGGG CGTT enthält.
5. Verwendung von Desoxyribonukleinsäuremolekülen nach Anspruch 1 bis 4 als Immunstimulans in Menschen oder höheren Tieren.

6. Verwendung von Desoxyribonukleinsäuremolekülen nach Anspruch 1 bis 4 zur Stimulation von Zellen des menschlichen oder tierischen Immunsystems in vitro oder in vivo.
7. Verwendung von Desoxyribonukleinsäuremolekülen nach Anspruch 1 bis 4 als Adjuvanz in der therapeutischen oder prophylaktischen Vakzinierung.
8. Desoxyribonukleinsäuremolekül mit immunmodifizierenden Eigenschaften, enthaltend unmethylierte Cytosin-Guanosin-Nukleosidbausteine ("CpG-Motiv"), gekennzeichnet dadurch, daß ~~ss~~
  - das Desoxyribonukleinsäuremolekül aus einer einsträngigen, ringförmigen, kovalent geschlossenen Kette von Desoxyribonukleosidresten besteht, und
  - innerhalb des Moleküs eine oder mehr Sequenzen der Basenfolge  $N^5N^6CGN^3N^8$  enthalten sind,

wobei  $N^5N^6$  ein Element aus der Gruppe NC oder CG,  $N^3N^8$  ein Element aus der Gruppe GN oder CG, sowie C Desoxycytosin, G Desoxyguanosin, A Desoxyadenosin, T Desoxymidin und N ein Element aus der Gruppe A,C,G oder T ist.

9. Desoxyribonukleinsäuremolekül gemäß Anspruch ~~8~~, wobei die Kette der Nukleinsäurebasen eine teilweise intramolekular selbstkomplementäre Sequenz aufweist, so daß das Molekül eine Stamm-Schlaufenstruktur ausbilden kann.
10. Desoxyribonukleinsäuremolekül nach Anspruch ~~8~~ oder ~~9~~, wobei die Sequenz der Basenfolge  $N^5N^6CGN^3N^8$  in der von der Stamm-Schlaufenstruktur gebildeten Schlaufe liegt.



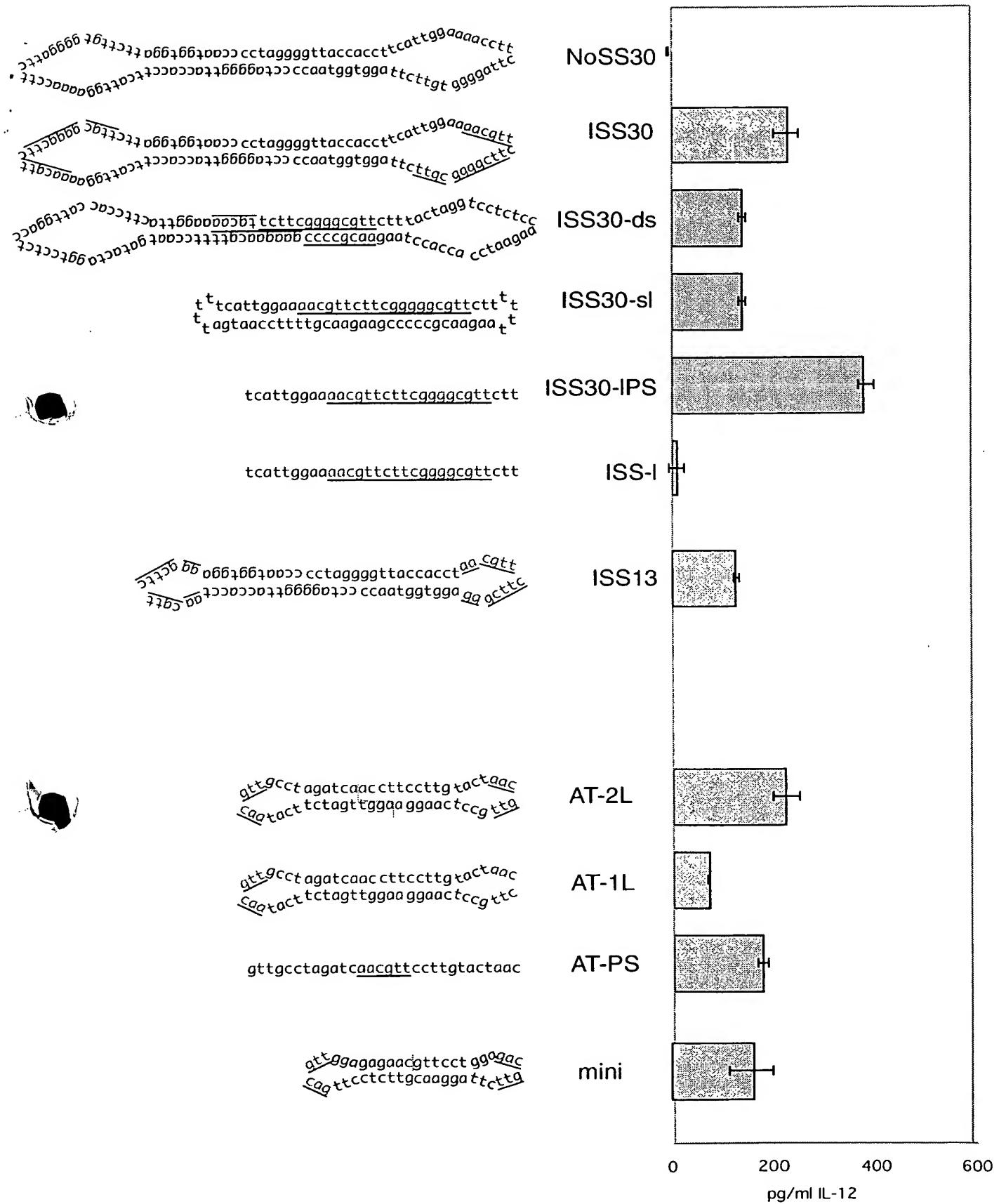
## **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft Desoxyribonukleinsäuremoleküle, welche zur Stimulation einer Immunantwort in höheren Tieren oder Menschen geeignet sind, insbesondere solche  
5 Desoxyribonukleinsäuremoleküle, welche unmethylierte CpG-haltige Sequenzen mit immunstimulatorischen Eigenschaften aufweisen. Erfindungsgemäß sind diese Moleküle aus einem teilweise selbstkomplimentären, kovalent ringförmig geschlossenen Einzelstrang aufgebaut und weisen gegenüber immunstimulatorischen Nukleinsäuresequenzen eine höhere Stabilität in vivo bzw. eine bessere Verträglichkeit auf.

**Abb. 1**

CGGG CGTCT AGGTGTTACCAACCCTAGGGGTACCAACCT AGGTGGTAACCCCTAGGGGTACCAACCT TCAATTGGA  
MAACG TTCTCGGGG CGTTCTT CATTGGAAAAACG TTCTT CGGG CGTCT AGGTGTTACCAACCCTAGGGGTACCAACCT TCAATTGGA

Abb. 2



**Abb. 3**

